

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 10 月 23 日 (23.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/086472 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 48/00, 39/395, 新宿区 信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 大山 学 (OHYAMA, Manabu) [JP/JP]; 〒160-8582 東京都 新宿区 信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/04765
- (22) 国際出願日: 2003 年 4 月 15 日 (15.04.2003) (74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052 東京都 港区 赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): US.
- (30) 優先権データ: 特願2002-112722 2002 年 4 月 15 日 (15.04.2002) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人 慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒108-8345 東京都 港区 三田二丁目 1 5 番 4 5 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 天谷 雅行 (AM-AGAI, Masayuki) [JP/JP]; 〒160-8582 東京都 新宿区 信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 西川 武二 (NISHIKAWA, Takeji) [JP/JP]; 〒160-8582 東京都
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DRUGS TO BE USED IN GENE THERAPY FOR RECESSIVELY TRANSMITTED GENETIC DISEASE

(54) 発明の名称: 遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤

(57) Abstract: It is intended to provide drugs to be used in gene therapy whereby an immune response to a transferred gene product in gene therapy for a recessively transmitted genetic disease can be inhibited, and a method of treating a genetic disease such as a recessively transmitted genetic disease by using such a drug. Namely, a drug to be used in gene therapy for recessively transmitted genetic disease containing an immunosuppressant and a gene responsible for a recessively transmitted genetic disease such as recessively transmitted trophic congenital epidermolysis bullosa, junctional congenital epidermolysis bullosa, hemidesmosomal congenital epidermolysis bullosa or congenital ichthyosis is prepared. The above-described immunosuppressant is exemplified by cyclosporin and CD40L antibody. The gene responsible for a recessively transmitted genetic disease as described above is usable in the form of a virus vector or a naked DNA.

(57) 要約: 劣性遺伝性疾患等の遺伝性疾患の遺伝子治療における導入遺伝子産物に対する免疫応答を抑制することができる遺伝子治療用薬剤や、かかる遺伝子治療用薬剤を用いての劣性遺伝性疾患等の遺伝性疾患の治療方法を提供するものである。免疫抑制剤と、劣性遺伝性栄養障害型先天性表皮水疱症、接合部型先天性表皮水疱症、ヘミデスモソーム型先天性表皮水疱症、先天性魚鱗癬等の劣性遺伝性疾患の責任遺伝子とを含む遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤を調製する。上記免疫抑制剤としては、シクロスポリンや抗 CD40L 抗体を挙げることができる。また、上記遺伝性疾患の責任遺伝子は、ウイルスベクターの形態や裸 DNA (Naked DNA) の形態等で用いることができる。

WO 03/086472 A1

明 細 書

遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤

5 技術分野

本発明は、常染色体劣性遺伝性疾患等の遺伝性疾患の遺伝子治療における導入遺伝子産物に対する免疫応答を抑制することができる遺伝子治療用薬剤や、かかる遺伝子治療用薬剤を用いての常染色体劣性遺伝性疾患等の遺伝性疾患の治療方法に関する。

10

背景技術

近年、様々な遺伝性疾患が多い皮膚科領域において、遺伝子診断が現実のものとなり、遺伝子診断による出生前診断が実際に施行されるようになり、基礎医学での成果が臨床に還元されるようになってきた。現在
15 では次のステップとして、遺伝的な欠損を根本的に治す治療法の開発が待ち望まれている。遺伝子治療を現実のものとするためには、効率のよい遺伝子導入法、持続性のある遺伝子発現法の開発など遺伝子発現そのものに関しても様々な問題が存在するが、各種ウイルスベクターの開発などにより、徐々にではあるが解決法の糸口が見えつつある。

20 しかし、現在まであまり取り上げられておらず、かつ、実際の臨床応用の際には必ず克服しなければならない課題として、外来から導入した遺伝子産物に対する免疫応答の問題がある。常染色体劣性の遺伝病の場合、責任遺伝子産物（特に、細胞外構成蛋白の場合）が罹患間患者の個体発生の段階から欠損しているため、免疫系が発生・分化する過程において、患者の免疫系はその蛋白に出会っていない。つまり、患者の個体
25 においてはその蛋白に対する免疫寛容が成立していない。従って、遺伝

子欠損による症状を是正するために、外来から正しい遺伝子を導入する遺伝子治療を施行した場合、個体が即座にその遺伝子産物を異物とみなして免疫応答が生じ、遺伝子治療の治療効果が失われる可能性がある。

5 こうした導入遺伝子産物に対する免疫応答は、その抑制の必要性が近年徐々に認識されてきつつあるが、現時点では主としてウイルスベクターを用いた、皮膚以外の臓器に対する遺伝子治療において、ベクターに対する免疫応答とともに論じられている程度であり（例えば、特表平10-507758号公報、特表2001-512142号公報など）、未だに十分な検討はなされていない。また、その抑制方法としては、遺伝子産物に対する免疫寛容の確立、免疫抑制剤の使用、免疫応答の確立に
10 必要な免疫応答細胞の表面分子の結合阻害などが試みられてきたが、確立されたものはないのが現状である。

以下、本発明に関する先行技術を列挙する。

- 1) Amagai M, Hashimoto T, Shimizu N, and Nishikawa T: Absorption
15 of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus. J Clin Invest 94:59-67, 1994
- 2) Amagai M, Klaus-Kovtun V, and Stanley JR: Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell
20 adhesion. Cell 67:869-877, 1991
- 3) Amagai M, Koch PJ, Nishikawa T, and Stanley JR: Pemphigus vulgaris antigen (Desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. J Invest Dermatol 106:351-355, 1996
- 25 4) Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Nishifuji K, Koyasu S, and Nishikawa T: Use of autoantigen-knockout mice in developing an

active autoimmune disease model for pemphigus. J Clin Invest
105:625-631, 2000

5 5) Chen M, O'Toole EA, Muellenhoff M, Medina E, Kasahara N, and
Woodley DT: Development and characterization of a recombinant
truncated type VIII collagen "minigene". Implication for gene
therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. J Biol Chem
275:24429-24435, 2000

6) Choate KA, Medalie DA, Morgan JR, and Khavari PA: Corrective gene
transfer in the human skin disorder lamellar ichthyosis. Nat Med
10 2:1263-1267, 1996

7) Christensen R, Jensen UB, and Jensen TG: Cutaneous gene
therapy-an update. Histochem Cell Biol 115:73-82, 2001

8) Dai Y, Schwarz EM, Gu D, Zhang W-W, Sarvetnick N, and Verma IM:
Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors
15 containing factor IX gene: Tolerization of factor IX and vector
antigens allows for long-term expression. Proc Natl Acad Sci
92:1401-1405, 1995

9) Datta SK, and Kalled SL: CD40-CD40 ligand interaction in
autoimmune disease. Arthritis Rheum 40:1735-1745, 1997

10 10) Dellambra E, Vailly J, Pellegrini G, Bondanza S, Golisano O,
Macchia C, Zambruno G, Meneguzzi G, and De Luca M: Corrective
transduction of human epidermal stem cells in laminin-5-dependent
junctional epidermolysis bullosa. Hum Gene Ther 9:1359-1370, 1998

11) Freiberg RA, Choate KA, Deng H, Alperin ES, Shapiro LJ, and
25 Khavari PA: A model of corrective gene transfer in X-linked
ichthyosis. Hum Mol Genet 6:927-933, 1997

1 2) Greenhalgh DA, Rothnagel JA, and Roop DR: Epidermis: An attractive target tissue for gene therapy. J Invest Dermatol 103:63S-69S, 1994

1 3) Hengge U, Chan EF, Foster RA, Walker PS, and Vogel JC: Cytokine
5 gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA. Nat Genet 10:161-166, 1995

1 4) Hengge UR, Walker PS, and Vogel JC: Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. J Clin Invest in press, 1996

1 5) Ilan Y, Prakash R, Davidson A, Jona V, Droguette G, Horwitz
10 MS, Chowdhury NR, and Chowdhury JR: Oral tolerization to adenoviral antigens permits long-term gene expression using recombinant adenoviral vectors. J Clin Invest 99:1098-1106, 1997

1 6) Jensen TG, Jensen UB, Jensen PK, Ibsen HH, Brandrup F, Ballabio
15 A, and Bolund L: Correction of steroid sulphatase deficiency by gene transfer into basal cells of tissue-cultured epidermis from patients with recessive X-linked ichthyosis. Exp Cell Res 209:392-397, 1993

1 7) Katsumi A, Emi N, Abe A, Hasegawa Y, Ito M, and Saito H: Humoral and cellular immunity to an encoded protein induced by direct DNA injection. Hum Gene Ther 5:, 1994

20 1 8) Kay MA, Hotlterman AX, Meuse L, Allen G, Ochs HD, Linsley PS, and Wilson CB: Long-term hepatic adenovirus-mediated gene expression in mice following CTLA4Ig administration. Nat Genet 11:191-197, 1995

1 9) Khavari PA: Gene therapy for genetic skin disease. J Invest
25 Dermatol 110:462-467, 1998

2 0) Khavari PA: Genetic correction of inherited epidermal

disorders. Hum Gene Ther 11:2277-2282, 2000

2 1) Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, Pulkkinen L, Uitto J, Shultz L, Murphy GF, Whitaker-Menezes D, and Stanley JR: Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. J Cell Biol 137:1091-1102, 1997

2 2) Larregina AT, and Falo LD: Generating and regulating immune responses through cutaneous gene delivery. Hum Gene Ther 11:2301-2305, 2000

10 2 3) Morral N, O'neal W, Zhou H, Langston C, and Beaudet A: Immune response to reporter proteins and high viral dose limit duration of expression with adenoviral vectors: comparison of E2a wild type and E2a deleted vectors. Hum Gene Ther 8:1275-1286, 1997

15 2 4) Ohyama M, Amagai M, Tsunoda K, Ota T, Koyasu S, Hata J, Umezawa A, and Nishikawa T: Immunologic and histopathologic characterization of active disease mouse model for pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol 118:199-204, 2002

20 2 5) Seitz CS, Giudice GI, Balding SD, Marinkovich MP, and Khavari PA: BP180 gene delivery in junctional epidermolysis bullosa. Gene Ther 6:42-47, 1999

Spirito F, Meneguzzi G, Danos O, and Mezzina M: Cutaneous gene transfer and therapy; the present and the future. J Gene Med 3:21-31, 2001

25 2 6) Stein CS, Martins I, and Davidson BL: Long-term reversal of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor (LDLR)-deficient mice by adenovirus-mediated LDLR gene transfer combined

with CD154 blokade. J Gene Med 2:41-51, 2000

2 7) Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E, and Leiden JM: Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expresson after injection of replication-defective adenovirus
5 vectors. Nat Med 2:545-550, 1996

2 8) Uitto J, and Pulkkinen L: The genodermatoses: candidate disease for gene therapy. Hum Gene Ther 11:2267-2275, 2000

2 9) Vailly J, Gagnoux-Palacios L, Del'Ambra E, Romero C, Pinola M, Zambruno G, De Luca M, Ortonne J-P, and Meneguzzi G: Corrective gene
10 transfer of keratinocytes from patients with junctional epidermolysis bullosa restores assembly of hemidesmosomes in reconstructed epithelia. Gene Ther 13:22-32, 1998

3 0) Vogel JC: Keratinocyte gene therapy. Arch Dermatol 129:1478-1483, 1993

15 3 1) Vogel JC: Nonviral skin gene therapy. Hum Gene Ther 11:2253-2259, 2000

3 2) Yamada A, and Sayegh MH: The CD154-CD40 costimulatory pathway in transplantation. Transplantation 73:S36-S39, 2002

3 3) Yang Y, Su Q, Grewal IS, Schilz R, Flavell RA, and Wilson JM:
20 Transient subversion of CD40 ligand function diminishes immune response to adenovirus vectors in mouse liver and lung tissues. 1996
70:6370-6377, 1996

3 4) Yao SN, Farjo A, Roessler BJ, Davidson BL, and Kurachi K: Adenovirus-mediated transfer of huma factor lX gene in
25 iummunodeficient and normal mice. Viral Immunol 9:141-153, 1996

3 5) Zeng L, Sarasin A, and Mezzina M: Retrovirus-mediated DNA

repair gene transfer into xeroderma pigmentosum cells. Cell Biol Toxicol 14:105-110, 1998

5 欠損遺伝子が知られている先天性の遺伝性疾患の治療には、欠損遺伝子を補充する遺伝子治療を施すことが必要とされるが、遺伝子欠損患者には欠損している遺伝子産物に対して免疫寛容が成立していないため、正しい遺伝子を導入した際、その遺伝子産物に対する免疫応答を惹起し、自己免疫を誘導してしまい、最終的に入れた遺伝子を正しく機能させることができない。本発明の課題は、常染色体劣性遺伝性疾患等の遺伝性疾患の遺伝子治療における導入遺伝子産物に対する免疫応答を抑制することができる遺伝子治療用薬剤や、かかる遺伝子治療用薬剤を用いての常染色体劣性遺伝性疾患等の遺伝性疾患の治療方法を提供することにある。

15 従来からの遺伝子治療における導入遺伝子産物に対する免疫応答の評価、そしてその抑制の試みにおいては、1) 不適切な免疫応答が生じる可能性は、発生の段階において導入遺伝子産物を完全に欠く、つまり常染色体劣性遺伝の表現型を有する個体に欠損遺伝子を導入した際に極めて高くなるにも関わらず、こうした遺伝子欠損個体を対象としておらず、単に被験対象個体に遺伝子導入を行い、産物に対する免疫応答の抑制法を評価している、2) 遺伝子導入法として主としてアデノウイルスを用いたウイルスベクターを用いた方法がとられており、ウイルスベクターに対する治療対象個体の免疫応答と関連のない、純粹に導入遺伝子産物のみに対する免疫応答、応答の抑制が評価されていない、3) ウイルスを用いない遺伝子導入法を用いた系では、抑制法の適応対象となる、導入遺伝子産物に対する免疫応答を評価できる程の安定した遺伝子発現が得られない、4) 効率がよく、副作用の少ない免疫応答抑制法の評価が

不十分である、などの問題点があった。

こうした従来技術の問題点に鑑み、本発明者らは、1) 遺伝子治療の対象とする疾患モデル動物の選定にあたっては、機能が十分に解明されている単一遺伝子の欠損を有し、かつ、その病態生理が十分に解明されているものとする、2) ウイルスを用いない遺伝子導入法を用いて純粹に導入遺伝子産物に対する免疫応答と、その抑制法のみ評価する、3) 安定した遺伝子発現が得られない場合には、遺伝子導入が成功した状態を模擬する適切な系を確立する、4) 薬剤などによらず、免疫応答の惹起に必須の生体内での経路を生物学的に遮断する生理活性物質を使用することで効率のよい免疫応答の抑制を実現する、ことをコンセプトとし、皮膚の構成成分が欠損しているノックアウトマウスに、正しい遺伝子を導入する遺伝子治療を施行し、その遺伝子産物に対する免疫応答の有無を確認し、遺伝子治療における免疫応答を解析できる実験動物モデルの系を作製した後、外来遺伝子産物に対する免疫応答を抑制するために、免疫寛容を成立させるなどの各種方法を検討した。

具体的には、表皮構成成分で細胞膜蛋白であるデスモグレイン3 (Dsg3) を欠損させたDsg3ノックアウト (Dsg3^{-/-}) マウスを用いた。このマウスは、細胞間接着分子であるDsg3が欠損しているために、口腔内における水疱・びらの形成、ならびに休止期 (telogen) にある被毛の脱毛を生じる。このマウスに対する遺伝子治療として、発現ベクターに組み込んだ正しい遺伝子配列を持ったマウスDsg3遺伝子を、Naked DNA injection 法を用いて表皮細胞に導入したところ、導入Dsg3遺伝子が表皮ならびに毛嚢において発現することが確認できた。また、発現したDsg3に対する抗体産生が持続することが確認されたが、遺伝子治療に先立ち、免疫抑制剤として抗CD40Lモノクローナル抗体を導入することにより、遺伝子治療の治療効果を損なう可能

性のある導入遺伝子産物 D s g 3 に対する免疫応答が効果的に抑制されることも確認することができた。本発明はこれら知見に基づいて完成するに至ったものである。

5 発明の開示

すなわち本発明は、免疫抑制剤と、遺伝性疾患の責任遺伝子とを備えたことを特徴とする遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤（請求項 1）や、免疫抑制剤と、遺伝性疾患の責任遺伝子とを含むことを特徴とする請求項 1 記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤（請求項 2）や、免疫抑制剤が、
10 T細胞表面上の接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体する受容体 C D 4 0 L と、抗原提示細胞表面上の受容体 C D 4 0 との間の相互作用を阻害するアンタゴニストを有効成分とすることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤（請求項 3）や、相互作用を阻害するアンタゴニストが、抗 C D 4 0 L 抗体であることを特徴とする請求項 3 記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤（請求項 4）や、
15 遺伝性疾患の責任遺伝子が、ウイルスベクターの形態又は裸 D N A (naked DNA) の形態であることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤（請求項 5）や、遺伝性疾患が、劣性遺伝性疾患であることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤（請求項 6）や、劣性遺伝性疾患が、常染色体劣性遺伝性疾患であることを特徴とする請求項 6 記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤（請求項 7）に関する。

また本発明は、請求項 1 ～ 7 のいずれか記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤を用いることを特徴とする遺伝性疾患の治療方法（請求項 8）
25 や、遺伝性疾患が、天疱瘡、劣性遺伝性栄養障害型先天性表皮水疱症、接合部型先天性表皮水疱症、ヘミデスモゾーム型先天性表皮水疱症、又

は先天性魚鱗癬であることを特徴とする請求項 8 記載の遺伝性疾患の治療方法（請求項 9）に関する。

図面の簡単な説明

- 5 第 1 図、Naked DNA injection 法による $Ds g 3^{-/-}$ マウス表皮への p c D N A : m D s g 3 の導入による $D s g 3$ の発現を示す、蛍光抗体直接法の結果を示す写真である。
 - a : p c D N A : m D s g 3 を導入した部位（矢印）
 - b : p c D N A を導入した部位（スケール：50 μm ）
- 10 第 2 図は、導入遺伝子産物 $D s g 3$ に対する I g G 抗体の産生を示す、E L I S A 法の結果を示す写真である。（縦軸：ELIZA 法の O D 値、横軸：治療開始後の日数）

第 3 図は、遺伝子治療により産生した抗 $D s g 3$ I g G 抗体の、遺伝子治療により発現させた $D s g 3$ への結合（矢印）を示す、蛍光抗体直接法の結果を示す写真である（スケール：50 μm ）。

- 15 第 4 図は、 $D s g 3^{+/+}$ マウスの植皮片（矢印）が生着した $D s g 3^{-/-}$ マウスを示す写真である。

第 5 図は、 $D s g 3^{+/+}$ をグラウト系における抗 $D s g 3$ I g G 抗体の産生を示す、E L I S A 法の結果を示す写真である。コントロールとしてハムスター I g G の投与を受けた群では約 2 週間で抗 $D s g 3$ I g G 抗体の産生が生じる（実線）が、MR 1 の投与を受けた群（点線）ではこの I g G 産生が有意に抑制されている。

（縦軸：マウス $D s g 3$ I g G E L I S A の O D 値、横軸：植皮からの日数）

- 20 第 6 図は、 $D s g 3^{+/+}$ グラフト系で産生される抗 $D s g 3$ I g G 抗体のインビボでの $D s g 3$ 分子への結合を示す、蛍光抗体直接法の結

果を示す写真である。

a : MR 1 を投与した D s g 3^{-/-} マウス群での植皮片の生着 (図 6 a 左) と、再植皮後 5 ~ 7 日目における再植皮片の生着 (図 6 a 右) (スケール : 1 c m)。

5 b : ハムスター I g G 投与群では植皮片に表皮細胞間への I g G の沈着が認められる (スケール : 5 0 μ m)。

c : MR 1 投与群では植皮片に表皮細胞間への I g G の沈着が認められない (スケール : 5 0 μ m)。

10 発明を実施するための最良の形態

本発明の免疫抑制剤と、遺伝性疾患の責任遺伝子とを備えたことを特徴とする遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤であれば特に制限されるものではなく、ここで遺伝性疾患とは、欠損遺伝子を補充する遺伝子治療を施した場合、欠損している遺伝子産物に対して免疫寛容が成立していない

15 遺伝性の疾患をいい、常染色体劣性遺伝性疾患や伴性劣性遺伝性疾患等の劣性遺伝性疾患を挙げることができ、上記常染色体劣性遺伝性疾患としては、天疱瘡、劣性遺伝性栄養障害型先天性表皮水疱症、接合部型先天性表皮水疱症、ヘミデスモゾーム型先天性表皮水疱症、先天性魚鱗癬、白児症、ティ・サックス病、ウィルソン病、嚢胞性線維症、フェニルケ

20 トン尿症、糖原病 I 型、ガラクトース血症等を具体的に例示することができ、伴性劣性遺伝性疾患としては、色盲、血友病 A、Duchenne 型筋ジストロフィー等を具体的に例示することができる。

上記免疫抑制剤としては、遺伝子治療を施した場合に欠損していた遺伝子産物により惹起される免疫応答を抑制しうるものであれば、公知の

25 免疫抑制剤をも含め、特に制限されるものではなく、シクロスポリン A、タクロリムス (FK 5 0 6)、シクロホスファミド、アザチオプリン、ミ

ゾリビン、ステロイド、メソトレキセート、抗ヒスタミン剤等の他、T細胞表面上の接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体する受容体CD40Lと、抗原提示細胞表面上の受容体CD40との間の相互作用を阻害するアンタゴニストを好適に例示することができ、かかるアンタゴニストとしては、CD40Lに対して向けられた抗体（例えばCD40Lに対するモノクローナル抗体）、CD40Lに対して向けられた抗体のフラグメント（例えばFab又は(Fab')₂フラグメント）、キメラ抗体、ヒト化抗体、可溶性CD40若しくは可溶性CD40L及びそれらのフラグメント、又はその他のCD40LとCD40との相互作用を阻害する化合物を挙げることができる。

上記遺伝性疾患の責任遺伝子は、通常、ウイルスベクターの形態、裸DNA (naked DNA) の形態、リポソーム包摂形態等で用いられ、責任遺伝子は、ゲノムDNA、cDNA、mDNA又は合成DNAであってもよい。上記ウイルスベクターは、DNA又はRNAウイルスをもとに作製できるが、由来するウイルス種は特に限定はされず、MoMLVベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、HIVベクター、センダイウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター等のいかなるウイルスベクターであってもよい。

例えば、アデノウイルスベクターとしては、ITR（逆位末端反復配列）と包膜配列とを含んでおり、E1アデノウイルス領域の総てまたは一部を欠いているものが好ましく、さらに、E3アデノウイルス領域の総てまたは一部を欠いていてもよいが、糖タンパク質gp19kをコードするE3領域の一部を保持していることが好ましい。また、HIVベクターは導入した核酸を染色体に組み込むため、該核酸である薬物遺伝子を長期間に渡って発現することができ、また、HIVベクターは、細胞表面分子であるCD4陽性T細胞への選択的な遺伝子導入が可能であ

る上に、細胞が分裂していない静止期でも染色体に組み込むことが可能であるため、例えば、H I Vの外皮タンパク質である Env タンパク質を、小水痘性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus) の外皮タンパク質である VSV-G タンパク質に置換したシュードタイプ型のH I Vウイルスベクターを用いれば、骨髓幹細胞、造血幹細胞、神経細胞、筋肉細胞などの静止期にある、いかなる細胞へも効率的に薬物遺伝子を導入することが可能となる。

裸DNA (naked DNA) 形態として、プラスミドDNAの形態を好適に例示することができ、かかるプラスミドとしては公知の動物細胞用発現ベクタープラスミドを挙げることができる。かかるベクタープラスミドは、ウイルスプロモーター、例えば、CMV (サイトメガロウイルス) プロモーター、RSV (ラウス肉腫ウイルス) プロモーター、HSV-1 ウイルスTK遺伝子のプロモーター、SV40 (シミアンウイルス40) 初期プロモーター、アデノウイルスMLP (主要後期プロモーター) プロモーターを含むものが好ましい。その他、トランスフェクトされた細胞を選択又は同定することができるマーカー遺伝子を含んでもよく、かかるマーカー遺伝子としては、抗生物質G418に対する耐性を付与するneo遺伝子 (ネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードしている)、dhfr (ジヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子、CAT (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) 遺伝子、pac (ピュエロマイシンアセチルトランスフェラーゼ) 遺伝子、gpt (キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ) 遺伝子を挙げることができる。

上記のように、本発明の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤は免疫抑制剤と遺伝性疾患の責任遺伝子とを備えたものであるが、免疫抑制剤が例えばCD40Lのようにタンパク質又はペプチドからなる場合、かかるタ

ンパク質又はペプチドをコードするDNAと責任遺伝子とを、ウイルスベクターやプラスミドベクターにコインテグレートして、免疫抑制剤と遺伝性疾患の責任遺伝子とを含む遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤とすることもできる。本発明の遺伝子治療用薬剤は、遺伝性疾患の患者に投与
5 することができる他、遺伝性疾患の発症が予想される患者に対しても投与することができる。

本発明の遺伝性疾患の治療方法は、上記本発明の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤を1回又は2回以上用いることにより行われ、免疫抑制剤と遺伝性疾患の責任遺伝子とを同時に、あるいは遺伝性疾患の責任遺伝子
10 で遺伝子治療を施した後に免疫抑制剤を投与することができるが、投与部位を異にしてもよい。投与は、注射等の非経口投与又は経口投与により、皮下、静脈内、筋肉内、腹膜内、滑液内、肺内、胃内、鼻腔内、気管内等に行うことができる。本発明の遺伝子治療用薬剤の剤形は、投与方法により適宜選択され、例えば、注射用途に適した医薬組成物として
15 は、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液および滅菌注射溶液または分散液を即座に調整するための滅菌粉末を挙げることができる。また、投与量は、治療効果を期待できる十分な量であり、患者の年齢、性差、薬剤に関する感受性、投与方法、疾患の履歴などにより適宜選択しうる。

20 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例1 [Naked DNA injection 法によるDsg3^{-/-}マウス表皮へのDsg3遺伝子の導入]

Dsg3は表皮細胞間の接着機構、デスモゾームの構成成分である細胞表面蛋白である。CMVのプロモーターを用いた発現ベクターである
25 pcDNAにマウスDsg3 (mDsg3) をサブクローニングし作製

したプラスミド (p c D N A : m D s g 3) を P B S で $1 \sim 10 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ の濃度に希釈した溶液を、既報の naked DNA injection の方法に従い D s g 3^{-/-}マウスの真皮浅層に注入した。注入 18 時間後に、プラスミド導入部位を生検して得られた組織切片を、抗 m D s g 3 モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体直説法で観察したところ、p c D N A : m D s g 3 を導入した部位の表皮細胞間に m D s g 3 の発現が確認された (図 1 a)。コントロールとして p c D N A を導入した部位ではこのような所見は見られなかった (図 1 b)。以上のことより、naked DNA injection 法により D s g 3 が通常のマウス個体内における発現部位に導入されることが明らかとなった。

実施例 2 [D s g 3 遺伝子導入による抗 D s g 3 I g G 抗体産生の検討]

Naked DNA injection 法により、表皮に D s g 3 遺伝子を導入した D s g 3^{-/-}マウスにおいて、導入遺伝子産物に対する抗体が産生されるか否かを、バキュウロウイルス発現系を用いて得られた組換え m D s g 3 を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (E L I S A) 法により検討した。遺伝子治療のプロトコールとして、1) $50 \mu\text{g} / \text{個体}$ の p c D N A : m D s g 3 を週 1 回投与、2) $50 \mu\text{g} / \text{個体}$ の p c D N A : m D s g 3 を週 2 回投与、3) $100 \mu\text{g} / \text{個体}$ の p c D N A : m D s g 3 を週 1 回投与、4) $100 \mu\text{g} / \text{個体}$ の p c D N A : m D s g 3 を週 2 回投与、5) $200 \mu\text{g} / \text{個体}$ の p c D N A : m D s g 3 を 1 回のみ投与、6) $200 \mu\text{g} / \text{個体}$ の p c D N A : m D s g 3 を 2 週に 1 回投与、のような投与方法を設定し、各プロトコールにつき 2 個体の D s g 3^{-/-}マウスを使用した。。を週一回投与した。このうち、2) から 4) までの投与方法で遺伝子を導入した D s g 3^{-/-}マウス各 1 個体、6) の方法で投与した 2 個体の血清中に E L I S A 法にて抗 D s g 3

I g G 抗体の産生が確認された。特に 6) の方法で遺伝子を導入した 2 個体では 60 日という長期にわたり抗体産生が持続することが確認された (図 2)。

5 実施例 3 [遺伝子治療により産生された抗 D s g 3 I g G 抗体の導入
遺伝子産物への結合性の検討]

10 D s g 3 遺伝子導入で産生された抗 D s g 3 抗体が、実際に個体内で遺伝子導入により発現させた D s g 3 を認識するか否かを確認した。E L I S A 法で抗体価の上昇が確認された D s g 3 ^{-/-}マウスの表皮に前述の手法をもちいて遺伝子導入をした後、治療部位を生検した。得られた組織切片を、抗マウス I g G ポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体直接法を用いて観察したところ、遺伝子導入部位に一致して表皮細胞間に I g G の沈着が確認された (図 3)。以上より、遺伝子治療の副産物として産生された導入遺伝子産物に対する抗体が、実際に導入遺伝子産物に結合する可能性が示された。

15 実施例 4 [安定した遺伝子導入を模擬する実験系 ; D s g 3 ^{+/+}マウス皮膚を D s g 3 ^{-/-}マウスに移植する系の確立]

20 以上までの検討により、D s g 3 ^{-/-}マウスに D s g 3 遺伝子を導入することにより導入遺伝子産物に対して抗体産生が生じ、かつ生じた抗体は導入遺伝子産物を認識しうることが示された。しかし、この検討で用いた naked DNA injection 法は、ヒト、ブタなどの表皮に厚みを持つ動物では比較的安定した遺伝子導入が期待できるが、マウスでは表皮がきわめて薄いため安定した遺伝子導入が期待できない。そこで、さらに遺伝子治療における免疫応答の検討を進めるため、D s g 3 ^{+/+}マウスの皮膚を D s g 3 ^{-/-}マウスに移植する系を確立した。植皮片が生着した個体 (図 4) では、局所的に表皮への D s g 3 導入が成功した状態が模
25 擬されていると考えられる。また、この系 (以下 D s g 3 ^{+/+}グラフ

ト系と略す)では植皮後約2週間で、naked DNA injection法による遺伝子導入を行った場合と同様に、抗Dsg3 IgG抗体の産生が生じることが前述のELISA法を用いた検討で確認された。そこで、以後の検討においては、安定したDsg3^{+/+}グラフト系を用いて遺伝子治療における免疫応答と、その抑制法を評価することとした。

実施例5 [抗CD40Lモノクローナル抗体を用いたDsg3^{+/+}グラフト系における抗Dsg3 IgG抗体産生の抑制の検討]

抗原特異的な免疫応答の抑制法としては、すでに様々な方法が報告されている。当初、本発明者らは経口寛容により免疫反応を抑制することを計画し、大腸菌発現ベクターを用いてDsg3蛋白を作製しマウスに経口投与したが、良好な結果を得ることはできなかった。そこで、免疫応答の確立に重要な役割を担っているCD40とCD40Lの結合を阻害することにより、Dsg3^{+/+}グラフト系における抗Dsg3抗体産生の抑制を試みた。CD40Lは抗原刺激を受けた活性化T細胞に一過性に発現されるII型細胞膜貫通蛋白であり、その受容体であるCD40はB細胞、樹状細胞、単球/マクロファージ、内皮細胞などに発現されている。CD40-CD40L間結合はサイトカイン産生などを促すことで細胞性免疫において重要な役割を担うのみならず、B細胞の増殖、抗体産生などにおいてもきわめて重要であることが明らかとなっており、この結合を阻害する抗CD40Lモノクローナル抗体を用いて、自己免疫性疾患、臓器移植などにおける免疫応答を抑制するところみがなされている。前述のごとくDsg3^{+/+}グラフト系においては、植皮後約2週間で、ELISA法を用いて血清中に検出される抗Dsg3 IgG抗体産生がすべての植皮をうけた個体で生じる。しかし、ハムスター由来抗マウスCD40L抗体であるMR1を、植皮後0日(1000μg/個体)、2日、4日、7日、14日、21日、28日(500μg/個

体) のスケジュールで腹腔内投与すると、この抗体産生は、有意に抑制されることがE L I S A法を用いて示された(図5)。

実施例6 [D s g 3 ^{+/+} グラフト系で産生される抗D s g 3 I g G抗体のインビボでのD s g 3分子への結合の評価]

- 5 D s g 3 ^{+/+} グラフト系において産生される抗D s g 3抗体が、実際にインビボでD s g 3分子に結合することを示すために、植皮後4~5週の時点で植皮片を生検し、表皮細胞間へのI g Gの沈着を抗マウスI g Gポリクローナル抗体をもちいた蛍光抗体直接法にて評価した。MR 1を投与したD s g 3 ^{-/-} マウス群では植皮片は生着し続けるが(図6
- 10 a左)、コントロールとしてハムスターI g Gを投与した群では植皮片は約3週で脱落する。そこで、この群においては植皮片が脱落した時点で、再植皮を行い、再植皮後5~7日目に再植皮片の生着を確認した(図6 a右)後に生検を行った。コントロール群では、表皮細胞間にI g Gの明らかな沈着が確認されたが(図6 b)、MR 1投与群ではこのような沈着は明らかではなかった(図6 c)。以上より、D s g 3 ^{+/+} グラフト系
- 15 においてMR 1が抗D s g 3 I g G抗体の産生を抑制することがインビボ、インビトロの両方のレベルで示された。

産業上の利用可能性

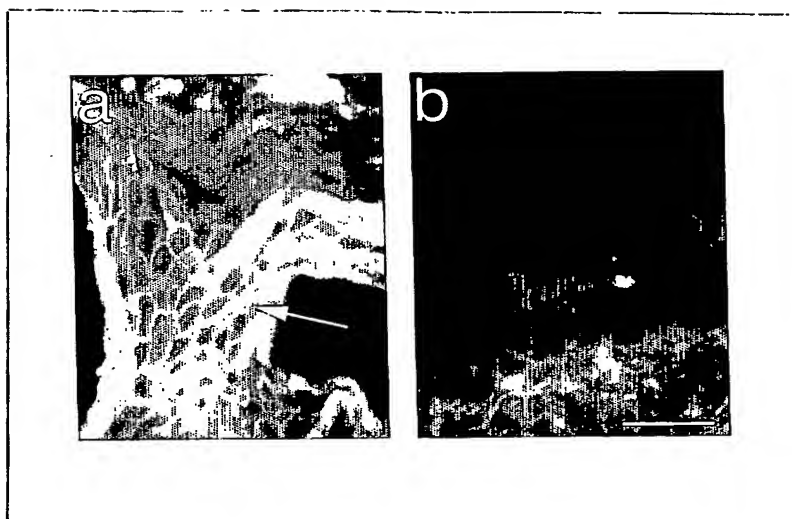
- 20 本発明により、治療に先立ち抗C D 4 0 Lモノクローナル抗体を導入することにより、劣性遺伝性疾患モデルマウスにおいて成功した遺伝子治療の治療効果を損なう可能性のある導入遺伝子産物に対する免疫応答が効果的に抑制されることが明らかになった。すなわち本発明によると、劣性遺伝性疾患に対する遺伝子治療を成功させるためには、導入遺伝子
- 25 産物に対する免疫産物に対する免疫応の抑制が必要であり、かつ抗C D 4 0 Lモノクローナル抗体がその抑制に有用であることが示された。

請 求 の 範 囲

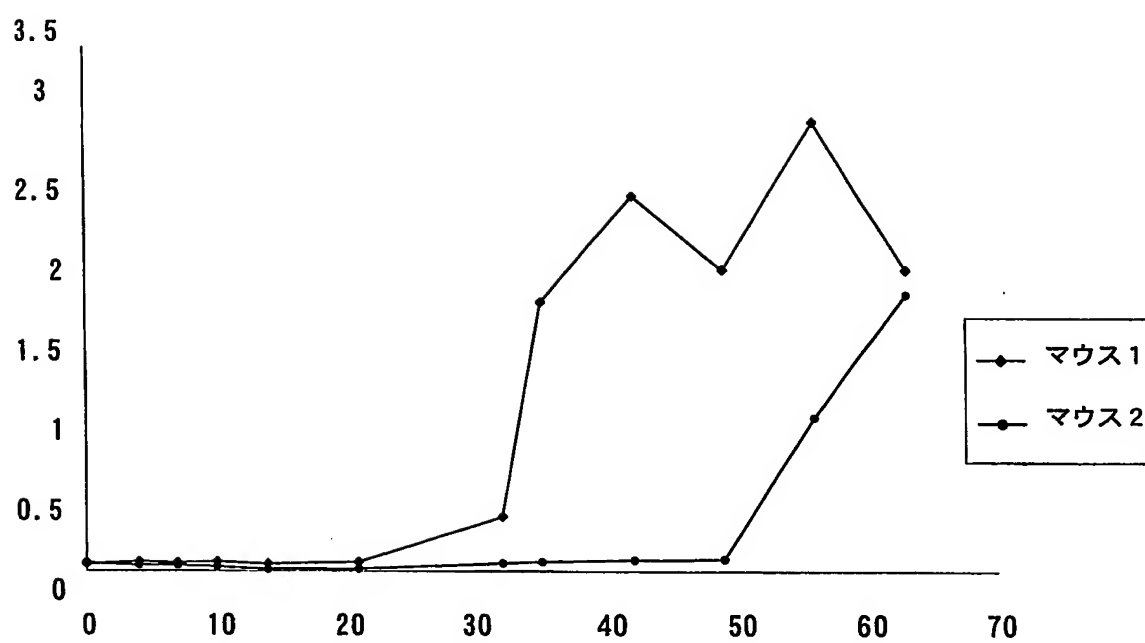
1. 免疫抑制剤と、遺伝性疾患の責任遺伝子とを備えたことを特徴とする遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤。
- 5 2. 免疫抑制剤と、遺伝性疾患の責任遺伝子とを含むことを特徴とする請求項 1 記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤。
3. 免疫抑制剤が、T細胞表面上の接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体する受容体CD40Lと、抗原提示細胞表面上の受容体CD40との間の相互作用を阻害するアンタゴニストを有効成分とすることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤。
- 10 4. 相互作用を阻害するアンタゴニストが、抗CD40L抗体であることを特徴とする請求項 3 記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤。
5. 遺伝性疾患の責任遺伝子が、ウイルスベクターの形態又は裸DNA (naked DNA) の形態であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤。
- 15 6. 遺伝性疾患が、劣性遺伝性疾患であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤。
7. 劣性遺伝性疾患が、常染色体劣性遺伝性疾患であることを特徴とする請求項 6 記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤。
- 20 8. 請求項 1～7 のいずれか記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤を用いることを特徴とする遺伝性疾患の治療方法。
9. 遺伝性疾患が、天疱瘡、劣性遺伝性栄養障害型先天性表皮水疱症、接合部型先天性表皮水疱症、ヘミデスモゾーム型先天性表皮水疱症、又は先天性魚鱗癬であることを特徴とする請求項 8 記載の遺伝性疾患の治療方法。
- 25

第 1 図

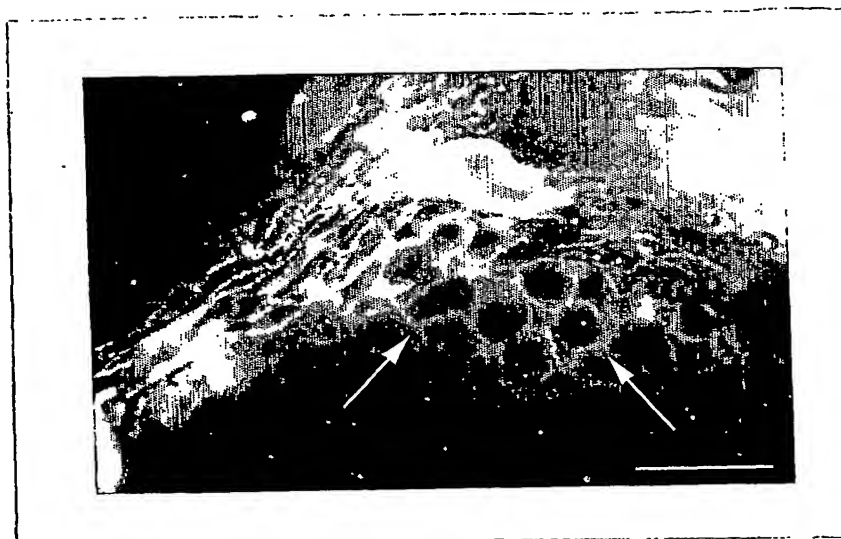
BEST AVAILABLE COPY



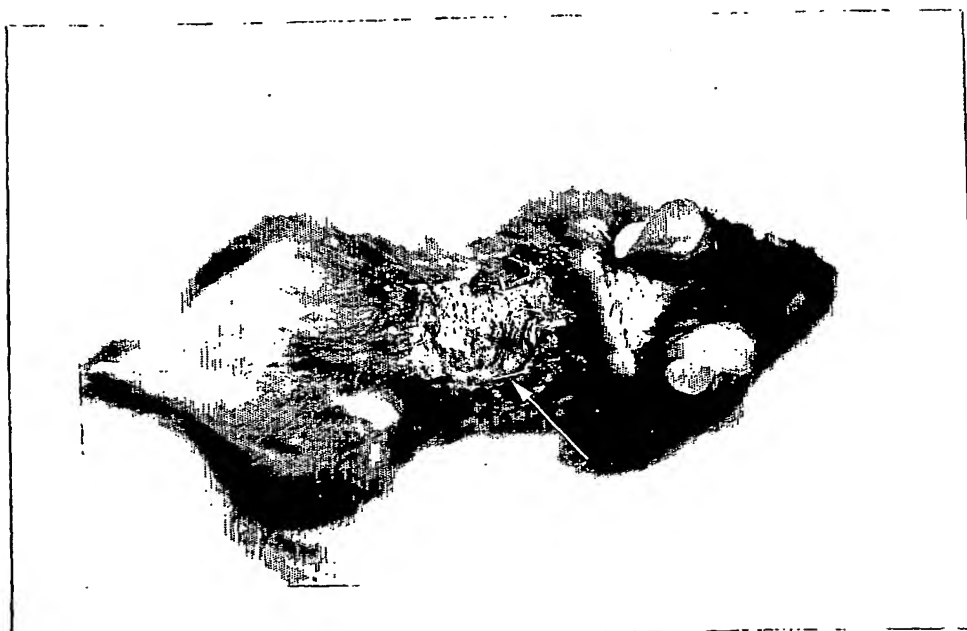
第 2 図



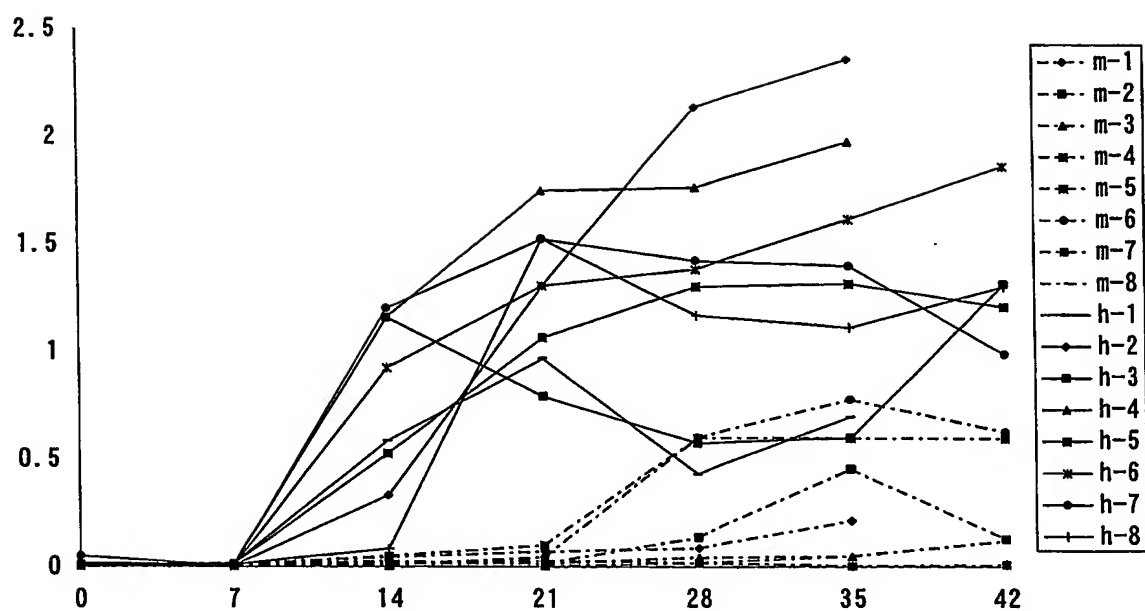
第 3 図



第 4 図

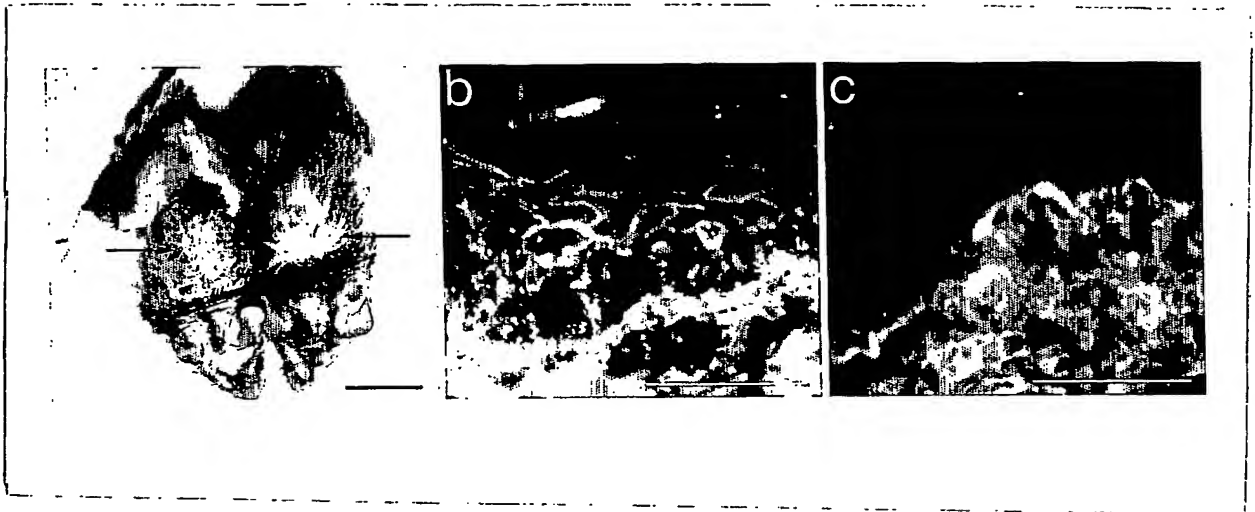


第 5 図



第 6 図

BEST AVAILABLE COPY



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04765

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K48/00, 39/395, 45/00, A61P17/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K39/395-39/44, 45/00, 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG) , WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	HERZOG, Ronald W. et al., Muscle-Directed Gene Transfer and Transient Immune Suppression Result in Sustained Partial Correction of Canine Hemophilia B Caused by a Null Mutation, Molecular Therapy, September 2001, Vol.4, No.3, pages 192 to 200, Especially, see abstract.	1, 2, 5-7 3, 4
X Y	FIELDS, Paul A. et al., Risk and Prevention of Anti-factor IX Formation in AAV-Mediated Gene Transfer in the Context of a Large Deletion of F9, Molecular Therapy, September 2001, Vol.4, No.3, pages 201 to 210, Especially, see abstract	1, 2, 5-7 3, 4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 July, 2003 (16.07.03)Date of mailing of the international search report
12 August, 2003 (12.08.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04765

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/06562 A1 (CHIRON CORP.), 11 February, 1999 (11.02.99), Especially, see page 9, lines 27 to 29 & AU 9886721 A & EP 1002078 A1 & JP 2001-512142 A	3-7
Y	WO 98/30241 A1 (BIOGEN, INC.), 16 July, 1998 (16.07.98), & AU 9857353 A & AU 721697 B & NO 9903275 A & CZ 9902443 A3 & EP 966302 A1 & BR 9807471 A & CN 1248921 A & HU 200001263 A2 & MX 9906437 A1 & NZ 337073 A & KR 2000070035 A & JP 2001-508450 A & US 2002/0071840 A1	3-7
A	EP 1142473 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORP.), 25 May, 2001 (25.05.01), & WO 01/35733 A1 & JP 2001-139496 A	1-7
A	WO 01/30383 A2 (BIONETWORKS GMBH.), 03 May, 2001 (03.05.01), & DE 19951970 A1 & AU 200119972 A & EP 1223974 A2 & KR 2002057986 A & JP 2003-512438 A & CN 1391479 A	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04765

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8, 9

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 8 and 9 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:


because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61K48/00, 39/395, 45/00, A61P17/00, 43/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61K39/395-39/44, 45/00, 48/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS (DIALOG) WPI (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	HERZOG, Ronald W. <i>et al.</i> , Muscle-Directed Gene Transfer and Transient Immune Suppression Result in Sustained Partial Correction of Canine Hemophilia B Caused by a Null Mutation, Molecular Therapy, September 2001, Volume 4, Number 3, pages 192-200 Especially, see abstract.	1, 2, 5-7 3, 4
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	16.07.03	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 内 田 俊 生  4 P 8 2 1 4 電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	FIELDS, Paul A. <i>et al.</i> , Risk and Prevention of Anti-factor IX Formation in AAV-Mediated Gene Transfer in the Context of a Large Deletion of <i>F9</i> Molecular Therapy, September 2001, Volume 4, Number 3, pages 201-210 Especially, see abstract.	1, 2, 5-7 3, 4
Y	WO 99/06562 A1 (CHIRON CORPORATION) 1999.02.11 Especially, see page 9 lines 27-29. & AU 9886721 A & EP 1002078 A1 & JP 2001-512142 A	3-7
Y	WO 98/30241 A1 (BIOGEN, INC.) 1998.07.16 & AU 9857353 A & AU 721697 B & NO 9903275 A & CZ 9902443 A3 & EP 966302 A1 & BR 9807471 A & CN 1248921 A & HU 200001263 A2 & MX 9906437 A1 & NZ 337073 A & KR 2000070035 A & JP 2001-508450 A & US 2002/0071840 A1	3-7
A	EP 1142473 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) 2001.05.25 & WO 01/35733 A1 & JP 2001-139496 A	1-7
A	WO 01/30383 A2 (BIONETWORKS GMBH) 2001.05.03 & DE 19951970 A1 & AU 200119972 A & EP 1223974 A2 & KR 2002057986 A & JP 2003-512438 A & CN 1391479 A	1-7

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8, 9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲8, 9に記載の発明は、治療による人体の処置方法に該当する。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。